

## *d*-3-Cinnamyloxy-N-Methylmorphinan の 抗腫瘍作用について

金沢大学医学部薬理学講座 (主任: 正印 達教授)

川 尻 博 男

(昭和60年1月7日受付)

新規に合成された *d*-morphinan 誘導体である *d*-3-Cinnamyloxy-N-methylmorphinan (DM 34) の抗腫瘍作用と免疫増強作用について検討した。DM 34 はデキストロメトルファンやジメモルファンと同様に、腫瘍移植後に投与した時 *in vivo* で腫瘍の増殖を抑制し、担がんマウスの生存日数を延長した。エールリッヒがん細胞 ( $2.0 \times 10^6$  細胞/頭) を腹腔内移植した 24 時間後から 5 日間連続して 40 mg/kg/日の DM 34 を ddY マウスに腹腔内投与すると、腫瘍の増殖は抑制され、担がんマウスの平均生存日数は生理的食塩水を投与したマウスに比べて 57.7% 延長した。DM 34 は腫瘍移植前に投与するとより顕著な延命作用を示した。しかし、デキストロメトルファンとジメモルファンには前投与による延命作用はみられなかった。DM 34 (40 mg/kg/日) を腫瘍移植 7 日前から 5 日間連続して腹腔内投与したエールリッヒ腹水がん担がんマウスの平均生存日数は 157.7% 延長した。さらに、エールリッヒ腹水がん移植 4 日前から 24 日前の間に DM 34 (40 mg/kg/日) の 4 日間連続投与を開始したマウスにも平均生存日数の延長がみられた。平均生存日数の延長は DM 34 投与と腫瘍移植の間隔が長くなるにしたがい徐々に減弱した。DM 34 はザルコーマ 180 を腹腔内移植したマウスに対しても同様な抗腫瘍作用を示した。DM 34 はマウスの細胞性免疫に影響を与えた。C57 BL/6 マウスの羊赤血球 (SRBC) に対する遅延型過敏反応 (DTH) は DM 34 (40 mg/kg) を SRBC で感作する 1 日前から 3 日後の間に 1 回投与することにより増強された。DM 34 をエールリッヒ腹水がん移植の 7 日前から 5 日間連続して 40 mg/kg/日投与することにより担がんマウスの DTH 低下は抑制され、また担がんマウスの胸腺と脾臓の重量の減少も抑制された。しかし、DM 34 は SRBC で免疫されたマウスの脾抗体産生細胞数には影響をおよぼさなかった。以上の結果より、DM 34 は宿主介在性の抗腫瘍作用とマウスの細胞性免疫を増強する作用をもつと考えられた。

---

**Key words** antitumor activity, *d*-morphinan, Ehrlich ascites carcinoma, sarcoma-180, delayed-type hypersensitivity.

---

麻薬性鎮痛薬は、中枢神経系に広汎に作用し、鎮痛作用、鎮咳作用、呼吸抑制作用などのほか内分泌系や自律神経系および平滑筋にも作用するなど多くの薬理作用を有している<sup>1)</sup>。この麻薬性鎮痛薬またはその類似薬ならびに関連薬には抗腫瘍作用と免疫抑制作用があることが最近報告されている。すなわち、Zagon, I. S. と McLaughlin, P. J.<sup>2)</sup> はヘロインがマウスの neuroblastoma の増殖を抑制することを報告してい

る。また、麻薬性鎮痛薬の拮抗薬であるナロキソンとナルトレキソンについては、Aylsworth, C. F.<sup>3)</sup> はラットの mammary tumor の増殖を抑制することを報告しており、Zagon, I. S. と McLaughlin, P. J.<sup>4)</sup> は、マウスの neuroblastoma の増殖を抑制すると報告している。近年、Kigoshi, S.<sup>5)</sup> は、非麻薬性の鎮痛薬であるペンタゾシンが *in vitro* で腫瘍細胞傷害作用をもち、エールリッヒ腹水がんおよびザルコーマ 180 を移

---

Abbreviations: BCG, *Bacillus Calmette-Guérin*; DM 34, *d*-3-cinnamyloxy-N-methylmorphinan; DTH, delayed-type hypersensitivity; FBS, fetal bovine serum; HBSS, Hanks balanced salt solution; PFC, plaque-forming cell; PS, physiological saline; SRBC, sheep red blood cell; Tris, trishydroxymethylaminomethan.

植したマウスの生存日数を延長することを報告している。さらに Kigoshi, S.<sup>7)</sup>は、非麻薬性の鎮咳薬であるデキストロメトルファンとジメモルファンにも同様の作用をみいだしている。一方、免疫抑制作用としては、モルヒネ<sup>8)~10)</sup>、コデイン<sup>10)</sup>およびペンタゾシン<sup>11)</sup>に、脾臓の萎縮、リンパ球芽球化の抑制、抗体産生細胞の減少などの作用があることが報告されている。

以上の事にもとづいて、デキストロメトルファンやジメモルファンと同じ *d*-morphinan 骨格をもつ一連の化合物<sup>12)</sup>が新規合成されたが、これらの中で特に抗腫瘍作用の強かった *d*-3-Cinnamyloxy-N-methylmorphinan (分子量 373.53, DM34) のマウス同種移植がんに対する抗腫瘍作用とマウス免疫系への作用について検討をおこなった。

#### 材料および方法

##### I. 実験動物

実験には ddY マウス (雌, 7~10 週令) または C57 BL/6 マウス (雄, 6~9 週令) を用いた。

##### II. 使用薬物

実験には、臭化水素酸デキストロメトルファン (マルコ製薬, 5 mg/ml 注射液) およびリン酸ジメモルファン (山之内製薬) を用いた。リン酸ジメモルファンは生理的食塩水に 6 mg/ml に溶解し、使用時まで 4°C に保存した。

DM34 (東洋ファルマー-K. K.) は、デキストロメトルファンより合成されたもので、図 1 のごとき構造を有していた。DM34 注射液は以下のように調製した。200 mg の DM34 と HCO-60 (日光ケミカルズ) 2 g を

耐熱ねじロビン (50 ml 容量, 柴田科学) で混合し、沸騰水浴中で完全に溶解させた。これに、あらかじめ 100°C に加温しておいた 50 ml の生理的食塩水を加え、振盪かくはんのち、密栓して約 2 気圧 120°C で 15 分間高圧滅菌した。滅菌後、溶液が 80°C 以上の間に高圧滅菌器よりとりだし、振盪かくはんしたのち、水中にて急速に冷やした。数時間後 DM34 が細かな結晶となり沈殿している注射液が作製された。使用時には、沈殿している DM 34 を振盪により均一に懸濁させてから注射をおこなった。

##### III. 腫瘍細胞浮遊液の調製

腫瘍細胞浮遊液は速度沈降法 (velocity sedimentation)<sup>13)~15)</sup>によって調製した。すなわち、エールリッヒがん細胞またはザルコーマ 180 細胞を腹腔内に移植して 7 から 10 日目の ddY マウスより 10 ml の腹水を採取し、40 ml のハンクス平衡塩類溶液 (pH 7.4, ハンクス液) と混和し遠心 (200 g, 5 分間) した。沈殿した腫瘍細胞を 40 ml のハンクス液に浮遊させたのち、500 ml のフラスコ内に 2 種類のショ糖ハンクス溶液で 2 層に重層させた溶液の上に、分液ロートに 1/1 注射針をチューブで接続した装置を用いて静かに重層した。2 層のショ糖ハンクス溶液は、上層にフェノールレッドを含んだ 1.0% ショ糖ハンクス溶液 150 ml, 下層にフェノールレッドを含まない 1.5% ショ糖ハンクス溶液 300 ml を用いて作製した。腫瘍細胞を 2 層のショ糖ハンクス溶液に重層して 4°C で 90 分間静置したのち、フラスコの底に沈んだ腫瘍細胞を集めてハンクス液に再浮遊させ、遠心洗滌した。その後適量のハンクス液に浮遊させ、血球計算盤を用いて細胞数を計

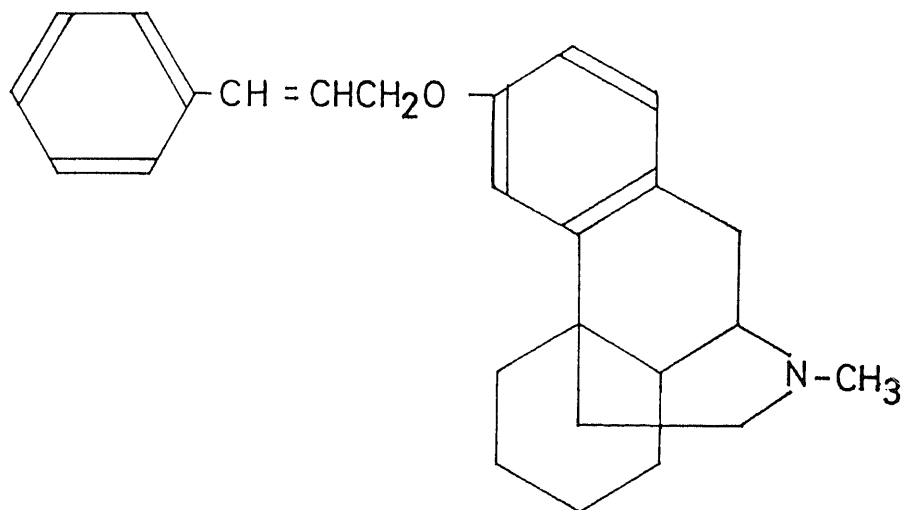


Fig. 1. *d*-3-Cinnamyloxy-N-Methylmorphinan

数したのち、さらにハンクス液を加えて  $4.0 \times 10^6$  細胞/ml の細胞浮遊液を作製した。この腫瘍細胞の生存率をトリパンブルー色素排除能テストで調べたところ、常に 85% 以上であった。

#### IV. 抗腫瘍実験

##### 1. *in vivo* 実験

腫瘍細胞はエールリッヒがん細胞またはザルコーマ 180 細胞を用いた。いずれかの腫瘍細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内に移植した 30 匹の ddY マウスを 1 群 10 匹ずつ 3 群に分けた。腫瘍細胞移植 24 時間後から、1 群には DM 34 を 20 mg/kg/日、次の 1 群には DM 34 を 40 mg/kg/日、残りの 1 群は対照群として生理的食塩水を 0.25 ml/頭/日、1 日 1 回、5 日間連続して腹腔内に投与した。エールリッヒがん細胞を移植したマウスでは腫瘍細胞移植後 10 日間、ザルコーマ 180 細胞を移植したマウスでは腫瘍細胞移植後 7 日間体重を測定することにより腫瘍の増殖を観察すると共に、マウスの生存を 60 日間観察した。

##### 2. DM 34 の前投与実験

あらかじめ各表 (表 3～表 8) に示されたいろいろの投与スケジュール、投与量で、DM 34、デキストロメトルフアンまたはジメモルフアンを前投与した 1 群 8～10 匹の ddY マウスに、 $2.0 \times 10^6$  細胞/頭のエールリッヒがん細胞またはザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した。これらのマウスについて、*in vivo* 実験と同様にして体重の変動と生存日数を観察した。

##### V. 担がんマウスの免疫担当臓器重量の測定

腫瘍細胞移植 7 日前から 3 日前までの 5 日間、40 mg/kg/日の DM 34 または 0.25 ml/頭/日の生理的食塩水を腹腔内投与したそれぞれ 30 匹の ddY マウスにエールリッヒがん細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内に移植した。ついで、DM 34 投与マウスおよび生理的食塩水投与マウスをそれぞれ 10 匹ずつ 3 群に分け、腫瘍細胞移植の 3 日後、6 日後および 12 日後に脾臓、胸腺および腸間膜リンパ節を摘出した。摘出臓器のまわりの結合組織等を除去し、血液などを生理的食塩水で洗滌除去したあと、その湿重量を測定した。対照としては、臓器摘出の 7 日前から 3 日前までの 5 日間、40 mg/kg/日の DM 34 または 0.25 ml/頭/日の生理的食塩水を腹腔内投与したそれぞれ 10 匹の非担がんマウスについて、その脾臓、胸腺および腸間膜リンパ節の湿重量を測定した。

##### VI. ヒツジ赤血球浮遊液の調製

Alserver 氏液<sup>16)</sup>と混和したヒツジ保存血は日本生物材料センター (東京) より購入し、採血日より 2 週間以内に実験に使用した。適当量のヒツジ保存血を 10 ml 遠心管にとり 700 g にて 10 分間遠心した。上清お

よびバフィーコートを、パスツールピペットを水流ポンプに接続した装置で吸引除去し、沈澱赤血球を生理的食塩水に再浮遊させた。これをさらに生理的食塩水で 3 回遠心洗滌をおこない、25% あるいは 5% の濃度に生理的食塩水に浮遊させたヒツジ赤血球 (sheep red blood cell, SRBC) 浮遊液、または 20% の濃度に 5% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 加ハンクス液に浮遊させた SRBC 浮遊液を作製した。生理的食塩水に浮遊させた 25% SRBC 浮遊液は、マウスの SRBC に対する遅延型過敏反応 (delayed-type hypersensitivity, DTH) の誘発に使用し、5% FBS 加ハンクス液に浮遊させた 20% SRBC 浮遊液は抗体産生細胞を検出するための指標赤血球浮遊液の作製に用いた。5% の濃度に生理的食塩水に浮遊させた SRBC 浮遊液は、その 1 ml に 14 ml の蒸留水を加えて溶血させ、541 nm で吸光度を測定し、この値と、 $1 \times 10^9$  SRBC/ml 浮遊液は 541 nm で吸光度値が 0.68 であることが示されている<sup>16)</sup>こととの関係から、SRBC 浮遊液の細胞数を求めた。この SRBC 浮遊液より  $5 \times 10^8$  細胞/ml あるいは、 $5 \times 10^6$  細胞/ml の SRBC の生理的食塩水浮遊液を作製し、マウスの感作に用いた。

#### VII. マウスの SRBC に対する DTH への DM 34 の影響に関する実験

DM 34 のマウス細胞性免疫におよぼす作用を調べる目的で、マウスの SRBC に対する DTH への DM 34 の影響に関する実験<sup>17)~19)</sup>をおこなった。すなわち、40 匹の C57 BL/6 雄性マウスを 1 群 5 匹ずつ 8 群に分け、SRBC で感作する 3 日前から 4 日後までの 8 日間の間で、DM 34 の 40 mg/kg 腹腔内投与を各群所定の時期におこなった。SRBC による感作は、生理的食塩水に浮遊させた  $5 \times 10^6$  細胞/ml の SRBC 浮遊液 0.2 ml ( $1 \times 10^6$  SRBC) を鼠窩静脈叢より静脈内注射<sup>19)20)</sup>しておこなった。感作より 4 日後、これらの各群のマウスの右後足蹠皮下に生理的食塩水に浮遊させた 25% SRBC 浮遊液 0.02 ml (約  $1 \times 10^8$  SRBC) を注射し、足蹠反応を誘発した。誘発から 24 時間後に右後足蹠と左後足蹠の厚さをノギスを用いて圧迫を加えないようにして測定し、その左右後足蹠の厚さの差を足蹠反応の大きさとした。対照として DM 34 を投与していない 2 群のマウス各 5 匹について、1 群には SRBC 感作をおこない、もう 1 群には SRBC 感作をおこなわずに足蹠反応を誘発し、その大きさを測定した。

#### VIII. 担がんマウスの DTH に及ぼす DM 34 前投与の影響に関する実験

腫瘍細胞移植 7 日前から 3 日前までの 5 日間、40 mg/kg/日の DM 34 または 0.25 ml/頭/日の生理的食塩水を腹腔内投与したそれぞれ 28 匹の ddY マウスに

エールリッヒがん細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内に移植した。ついで、DM 34 投与マウスおよび生理的食塩水投与マウスをそれぞれ 7 匹ずつ 4 群に分け、腫瘍細胞移植 1 日後、3 日後、5 日後および 7 日後に、生理的食塩水に  $5 \times 10^6$  細胞/ml に浮遊させた SRBC 浮遊液 0.2 ml ( $1 \times 10^8$  SRBC) を右鼠蹊部皮下に注射して感作した。感作より 4 日後、すなわち腫瘍細胞移植の 5 日後、7 日後、9 日後および 11 日後に各群のマウスの右後足蹠皮下に SRBC の 25% 生理的食塩水浮遊液 0.02 ml (約  $1 \times 10^8$  SRBC) を注射し、誘発された足蹠反応を 24 時間後に測定した。対照として、DM 34 を投与せず、エールリッヒがん細胞の腹腔内移植もおこなっていないマウス 14 匹について、7 匹は SRBC で感作をおこない、7 匹は SRBC で感作をおこなわないで足蹠反応を誘発し、その大きさを測定した。

#### IX. 抗体産生細胞数への DM 34 の影響に関する実験

DM 34 を投与した ddY マウスの SRBC に対する抗体産生細胞数を Cunningham<sup>21)-23)</sup>の方法により下記の如くにして測定した。

##### 1. DM 34 の投与

40 匹の ddY マウスを 1 群 5 匹ずつ 8 群に分け、7 群のマウスにはそれぞれ SRBC 感作の 2 日前、1 日前、感作日、感作の 1 日後、2 日後、3 日後および 4 日後に 40 mg/kg の DM 34 を腹腔内に 1 回投与した。残る 1 群のマウスは DM 34 を投与しない対照群とした。

##### 2. SRBC によるマウスの感作

生理的食塩水に  $5 \times 10^6$  細胞/ml の濃度に浮遊させた SRBC 浮遊液 0.2 ml ( $1 \times 10^8$  SRBC) を DM 34 を投与した各群のマウスおよび対照群のマウスに静注して感作した。

##### 3. 脾細胞浮遊液の調製

SRBC による感作から 4 日後、DM 34 を投与した各群のマウスおよび対照群のマウスより脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を Shirahata の方法<sup>24)25)</sup>により作製した。すなわち、径 60 mm のプラスチックシャーレ (Corning 25010) に摘出した脾臓を 1 個いれ、3 ml のハanks 液を加えた。ついでプラスチック製の 1 ml ツベルクリン注射筒 (テルモ) 内筒底部を用いて脾臓を破碎したあと、さらに 7 ml のハanks 液を加えて脾細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液を金属メッシュでろ過して結合組織を除去したのち遠心 (200 g, 10 分間) した。ついで、生じた沈澱を 5 ml の Tris 緩衝塩化アンモニウム溶液 (0.83% 塩化アンモニウム溶液 90 ml, 1N 塩酸で pH 7.65 に調整した 0.17 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン液 10 ml) に浮遊させ、室

温に 10 分間静置して赤血球を溶血除去した。ついで、脾細胞をハanks 液にて 3 回遠心洗滌 (200 g, 10 分間) し、洗滌脾細胞を 5% FBS 加ハanks 液に浮遊させ、全量を 5 ml とした。血球計算盤を用いて細胞数を計数したところ、この細胞浮遊液はほぼ  $2 \times 10^7$  細胞/ml で、1 個の脾臓より約  $1 \times 10^8$  個の細胞が得られた。また、トリパンブルー色素排除能テストによる生存率の測定をおこなったところ、生存率は 90% 以上であった。この細胞浮遊液を 5% FBS 加ハanks 液で 8 倍に希釈 (約  $2.5 \times 10^6$  細胞/ml) したのち抗体産生細胞の検出をおこなった。

##### 4. 指標赤血球浮遊液の調製

5% FBS 加ハanks 液に浮遊させた 20% SRBC 浮遊液 0.2 ml にモルモット補体 (LOW-TOX guinea pig complement, CL45051, CEDARLANE, Ontario, Canada) 0.2 ml と 5% FBS 加ハanks 液 0.7 ml を加え、指標赤血球浮遊液とした。

##### 5. Cunningham の chamber の作製

清浄スライドグラス (マツナミ S 7213) 2 枚を 12 mm 幅の両面粘着テープ (スコッチ Na665) を用いて、中央部と両端の 3 か所ではりあわせて 2 室の chamber を作製した。この Cunningham chamber の容積は約 40  $\mu$ l であった。

##### 6. 抗体産生細胞の検出

脾細胞浮遊液 25  $\mu$ l と指標赤血球浮遊液 15  $\mu$ l をシーロンフィルム (富士フィルム) 上で混和し、毛細管ピペットを用いて Cunningham の chamber にいれた。その後ただちに、ホットプレート上で溶解させたパラフィン (融解点 62~64°C, 和光純薬) に開放している chamber の両端をわずかに浸し chamber を密封した。この chamber を水平に保ち、37°C に 1 時間静置したあと、chamber 内に形成されたプラーク数を数えた。この脾細胞 25  $\mu$ l あたりのプラーク形成細胞 (Plaque-forming cell, PFC) 数より、脾臓 1 個についての PFC 数、すなわち IgM 抗体産生細胞数<sup>26)</sup>を算出した。

## 成 績

### I. *in vivo* 実験の成績

エールリッヒがん細胞あるいはザルコーマ 180 細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内移植し、その 24 時間後より DM 34 を 40 mg/kg/日、20 mg/kg/日または対照として生理的食塩水を 0.25 ml/頭/日、1 日 1 回 5 日間腹腔内投与した ddY マウスの体重変化と生存日数の結果を表 1 と表 2 に示した。エールリッヒがん細胞を移植し、DM 34 を 40 mg/kg/日投与したマウスでは、10 日間の平均体重増加は  $2.1 \pm 0.1$  g と対照群の  $12.8 \pm$

0.8 g に比して有意に小さく、腹水がん細胞の増殖が抑制されていた。また平均生存日数も  $31.7 \pm 2.3$  日と対照群の  $20.1 \pm 1.9$  日に比し有意に延長し、その延命率  $((T-C)/C \times 100; T, DM 34$  投与群の平均生存日数;  $C$ , 対照群の平均生存日数) は 57.7% であった。しかし、60 日生存マウスは 10 匹中 0 匹であった。DM 34 を 20 mg/kg/日投与したマウスには有意の体重増加抑制も、平均生存日数の延長もみられなかった。ザルコーマ 180 細胞を移植したマウスでもエールリッヒがん細胞を移植したマウスと同様の結果が得られた。すなわち、DM 34 を 40 mg/kg/日投与したマウスの 7 日間の平均体重増加は  $2.3 \pm 0.5$  g と対照群の  $9.2 \pm 0.9$  g より有意に抑制され、平均生存日数も  $20.9 \pm 1.4$  日と対照群の  $12.8 \pm 0.8$  日より有意に延長しており、その延命率は 63.3% であった。20 mg/kg/日の投与量では、有意の体重増加抑制も平均生存日数の延長もみられなかった。

## II. 前投与実験の成績

d-morphinan 骨格をもつ DM 34, デキストロメトルファンおよびジメモルファンを腫瘍細胞移植 7 日前から 3 日前までの 5 日間、表 3 および表 4 に示した

様々な用量で 1 日 1 回腹腔内投与し、エールリッヒがん細胞またはザルコーマ 180 細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内移植した ddY マウスの体重変化と平均生存日数の結果を表 3 と表 4 に示した。腫瘍細胞移植前投与したデキストロメトルファンとジメモルファンはエールリッヒがん細胞あるいはザルコーマ 180 細胞を移植したマウスに対して抗腫瘍作用を示さなかった。しかし、DM 34 を前投与すると、40 mg/kg/日の投与量で顕著な抗腫瘍作用を示した。すなわち、エールリッヒがん細胞を移植したマウスでは、10 日間の平均体重増加は  $2.1 \pm 0.1$  g と対照群より有意に抑制され、平均生存日数は  $56.8 \pm 1.8$  日 (60 日以上生存したマウスの生存日数は 60 日として計算した) と対照群の  $22.3 \pm 2.0$  日より有意に延長し、その延命率は 154.7% であった。また、10 匹中 7 匹が 60 日間生存した。ザルコーマ 180 細胞を移植したマウスでは、7 日間の平均体重増加は  $2.9 \pm 0.6$  g, 平均生存日数は  $26.0 \pm 5.6$  日と対照群の  $7.1 \pm 0.2$  g および  $10.0 \pm 0.5$  日に比して有意に抑制あるいは延長し、延命率は 160.0% であった。また 10 匹中 1 匹が 60 日間生存した。DM 34 を 20 mg/kg/日前投与したマウスには、エールリッヒ腹水がんおよび

Table 1. Antitumor effect of DM34 on Ehrlich accites carcinoma

Dose (mg/kg/day)	Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 10 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a</sup>	ILS (%) <sup>b</sup>	Survivors on 60th day
40	+1~+5	$2.1 \pm 0.1$ *	$31.7 \pm 2.3$ *	57.7	0/10
20	+1~+5	$7.4 \pm 1.4$	$23.9 \pm 2.1$	18.9	0/10
0 (Control)	+1~+5	$12.8 \pm 0.8$	$20.1 \pm 1.9$	0	0/10

Female ddY mice were used. Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. into the mice on day 0. DM34 was injected i.p. daily on days 1 to 5. DM34 was suspended to 4 mg/ml in 0.85% saline (PS) containing 4% HCO-60. The control mice were injected i.p. with 0.25 ml/head of PS. <sup>a</sup>; Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. <sup>b</sup>; Increase of lifespan (ILS (%)) was calculated as follows:  $ILS (\%) = (T - C) / C \times 100$ ; T, mean survival days of treated mice; C, mean survival days of control mice. \*; Significantly different from control group at  $p < 0.01$  (with the Student's *t*-test).

Table 2. Antitumor effect of DM34 on sarcoma-180

Dose (mg/kg/day)	Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 7 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a</sup>	ILS (%) <sup>b</sup>	Survivors on 60th day
40	+1~+5	$2.3 \pm 0.5$ *	$20.9 \pm 1.4$ *	63.3	0/10
20	+1~+5	$7.9 \pm 0.4$	$11.7 \pm 1.1$	-8.6	0/10
0 (Control)	+1~+5	$9.2 \pm 0.9$	$12.8 \pm 0.8$	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 1. However, sarcoma-180 cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. on day 0. <sup>a, b</sup> and \*; See Table 1.

ザルコーマ 180 のいずれの腫瘍に対しても抗腫瘍作用はみとめられなかった。

DM 34 を 40 mg/kg/日の投与量で腫瘍移植の 6 日前より 3 日前までの 4 日間、5 日前より 3 日前までの

3 日間、4 日前と 3 日前の 2 日間および 3 日前の 1 日のみ投与した各群 10 匹よりなる 4 群の ddY マウスを用意し、これにエールリッヒがん細胞あるいはザルコーマ 180 細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内移植し、マ

Table 3. Effects of pretreatment with DM34, dextromethorphan and dimemorphan on Ehrlich ascites carcinoma

Drug	Dose (mg/kg/day)	Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 10 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a, b</sup>	ILS(%) <sup>c</sup>	Survivors on 60th day
DM34	40	-7~-3	2.1±0.1*	56.8±1.8*	154.7	7/10
	20	-7~-3	6.3±0.7	26.0±2.8	16.6	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	7.9±0.5	22.3±2.0	0	0/10
Dextromethorphan	60	-7~-3	10.7±0.5	26.5±2.7	20.5	0/10
	30	-7~-3	10.8±0.5	22.7±2.4	3.2	0/10
	15	-7~-3	10.6±0.5	21.1±3.0	-4.1	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	9.0±0.3	22.0±2.7	0	0/10
Dimemorphan	60	-7~-3	13.0±0.8	22.4±3.2	3.7	0/10
	30	-7~-3	11.7±0.6	17.6±2.1	-19.0	0/10
	15	-7~-3	11.8±0.7	16.2±1.8	-25.0	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	13.9±0.9	21.6±2.7	0	0/10

The drugs were injected i.p. into the mice according to the indicated doses on days -7 to -3. On day 0, Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Dimemorphan was dissolved to 6 mg/ml in PS. <sup>a</sup> and <sup>\*</sup>; See Table 1. <sup>b</sup>; Survival days of the mouse which survived for 60 days after tumor inoculation were defined 60. <sup>c</sup>; See Table 1<sup>b</sup>. <sup>d</sup>; The control mice were injected i.p. with 0.25 ml/head of PS.

Table 4. Effect of pretreatment with DM34, dextromethorphan and dimemorphan on saconma-180

Drug	Dose (mg/kg/day)	Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 7 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a, b</sup>	ILS (%) <sup>c</sup>	Survivors on 60th day
DM34	40	-7~-3	2.9±0.6*	26.0±5.6*	160.0	1/10
	20	-7~-3	5.7±0.4	9.9±0.7	-1.0	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	7.1±0.2	10.0±0.5	0	0/10
Dextromethorphan	60	-7~-3	6.9±0.2	10.2±0.8	4.1	0/10
	30	-7~-3	7.2±0.4	13.2±2.0	34.7	0/10
	15	-7~-3	6.0±0.4	10.5±0.7	7.1	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	6.0±0.4	10.5±0.7	0	0/10
Dimemorphan	60	-7~-3	6.4±0.1	11.6±1.3	6.4	0/10
	30	-7~-3	8.9±0.5	11.8±1.3	8.3	0/10
	15	-7~-3	8.3±0.3	11.3±1.4	3.7	0/10
PS (Control) <sup>d</sup>	-	-7~-3	7.1±0.2	10.9±1.2	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 3. However, sarcoma-180 cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. on day 0. <sup>a</sup> and <sup>\*</sup>; See Table 1. <sup>b</sup> and <sup>d</sup>; See Table 3. <sup>c</sup>; See Table 1<sup>b</sup>.

ウスの体重変化と生存日数を観察した成績を表5および表6に示した。対照群として、DM 34を投与していない10匹のddYマウスを用いた。DM 34をエールリッヒがん細胞移植6日前から3日前までの4日間前投与したマウスの平均体重増加は $6.8 \pm 1.8$  g, 平均生存日数は $33.1 \pm 6.4$ 日と、対照群の $12.0 \pm 0.6$  gと $19.1 \pm 2.6$ 日にくらべて有意の差がみられた。また、60日間生存マウスは10匹中3匹であった。しかし、投与日数が3日間以下の各スケジュールでDM 34を投与したマウスには抗腫瘍作用はみられなかった。ザルコーマ180細胞を移植した実験の結果は表6に示し

た。ザルコーマ180に対しては、4日間以下の投与日数の各スケジュールで有意の延命効果はみられなかった。

DM 34前投与の時期の影響を検討するため、DM 34の投与量と投与期間を40 mg/kg/日、4日間と一定にし、投与開始時期をエールリッヒがん細胞腹腔内移植( $2.0 \times 10^6$ 細胞/頭)の24日前から4日前までの間で8段階に分けてDM 34を投与し、その抗腫瘍作用をみた実験の結果を表7に示した。担がんマウスの平均生存日数は、腫瘍細胞移植4日前よりDM 34投与を開始した群で $39.7 \pm 6.6$ 日(延命率102.1%)と最も長く、

Table 5. Effect of administration schedule on the antitumor effect of DM34 pretreatment on Ehrlich ascites carcinoma

Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 10 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a, b</sup>	ILS (%) <sup>c</sup>	Survivors on 60th day
-6~-3 (for 4 days)	$6.8 \pm 1.8^*$	$33.1 \pm 5.9^*$	73.3	3/10
-5~-3 (for 3 days)	$10.4 \pm 1.5$	$16.6 \pm 1.5$	-13.1	0/10
-4, -3 (for 2 days)	$10.7 \pm 1.1$	$23.9 \pm 3.1$	25.1	0/10
-3 (1 day)	$13.2 \pm 1.0$	$20.7 \pm 2.0$	8.4	0/10
(Control)	$12.0 \pm 0.6$	$19.1 \pm 2.6$	0	0/10

Mice were injected i.p. with DM34 (40 mg/kg/day) once a day for 1, 2, 3 or 4 days according to the indicated schedules. On day 0, Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. into the mice. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Control mice were not injected any agent. <sup>a</sup> and <sup>c</sup>; See Table 1<sup>a</sup> and <sup>b, b</sup>; See Table 3. <sup>\*</sup>; Significantly different from control group at  $p < 0.05$  (with the Student's *t*-test)

Table 6. Effect of administration schedule on the antitumor effect of DM34 pretreatment on sarcoma-180

Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 7 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a</sup>	ILS (%) <sup>b</sup>	Survivors on 60th day
-6~-3 (for 4 days)	$4.9 \pm 0.9^*$	$15.1 \pm 2.4$	39.8	0/10
-5~-3 (for 3 days)	$6.7 \pm 1.0$	$11.5 \pm 0.8$	6.5	0/10
-4, -3 (for 2 days)	$6.4 \pm 0.6$	$12.6 \pm 0.8$	15.8	0/10
-3 (1 day)	$8.6 \pm 0.8$	$10.7 \pm 1.3$	-0.9	0/10
(Control)	$7.9 \pm 0.5$	$10.8 \pm 1.0$	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 5. However, sarcoma-180 cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. into the mice on day 0. <sup>a</sup> and <sup>b</sup>; See Table 1. <sup>\*</sup>; See Table 5.

投与開始日が腫瘍細胞移植日とはなれるに従い平均生存日数は短くなったが、いずれの群においても延命率は30%以上であった。DM 34 投与を40 mg/kg/日、5日間と一定にし、投与開始時期をザルコーマ180細胞腹腔内移植( $2.0 \times 10^6$ 細胞/頭)の20日前から5日前までの7段階に設定して抗腫瘍作用をみた実験の結果を表8に示した。その結果、腫瘍細胞移植7日前よりDM 34を投与した群に最も強い延命効果(延命率133.9%)がみられた。また、いずれの実験群においても延命率は30%以上であった。

### Ⅲ. マウスのDTHに対するDM 34の影響

$10^6$ 個のSRBCを静脈内注射して感作する3日前から4日後の8日間に40 mg/kgのDM 34を腹腔内へ

1回投与した各群のC57 BL/6マウスに感作から4日後に右後足蹠皮下に約 $10^6$ 個のSRBCを注射して誘発した足蹠反応の大きさを表9に示した。DM 34を投与しないで感作をおこなった非投与対照群マウスの足蹠反応は $1.33 \pm 0.07$  mmであり、DM 34投与もSRBCによる感作もおこなわなかった非感作対照群マウスの足蹠反応は $0.31 \pm 0.05$  mmであった。DM 34を感作1日前、感作日、感作1日後、2日後または3日後に投与した各実験群のマウスではSRBCに対するDTHが増強しており、その足蹠反応は感作1日後にDM 34を投与した実験群が $1.89 \pm 0.10$  mmと最大の値を示した。しかし、感作3日前、2日前および感作4日後にDM 34を投与したマウスの足蹠反応は

Table 7. Duration of antitumor effect of DM34 pretreatment on Ehrlich ascites carcinoma

Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 10 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a, b</sup>	ILS (%) <sup>c</sup>	Survivors on 60th day
-24~-21	$8.6 \pm 1.7$	$25.8 \pm 5.0$	31.1	1/8
-19~-16	$4.9 \pm 1.4^{**}$	$28.1 \pm 5.1$	43.1	0/8
-14~-11	$5.6 \pm 1.9^*$	$28.4 \pm 5.8$	44.4	1/8
-12~-9	$8.5 \pm 2.1$	$33.4 \pm 6.6^*$	69.9	1/8
-10~-7	$10.4 \pm 2.5$	$32.0 \pm 5.8^*$	62.9	1/8
-8~-5	$5.2 \pm 1.3^*$	$28.9 \pm 4.0^*$	47.0	0/8
-6~-3	$6.0 \pm 2.0^*$	$32.4 \pm 6.0^*$	64.5	2/8
-4~-1	$7.6 \pm 1.8^*$	$39.7 \pm 6.6^{**}$	102.1	2/8
None (Control)	$11.7 \pm 0.9$	$19.7 \pm 1.6$	0	0/8

Mice were injected i.p. with DM34 (40 mg/kg/day) before tumor inoculation for 4 days according to the indicated schedules. On day 0, Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Control mice were not injected any agent. <sup>a</sup>; Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. of 8 mice. <sup>b</sup>; See Table 3. <sup>c</sup>; See Table 1<sup>b</sup>. \*and \*\*; Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (with the Student's *t*-test), respectively.

Table 8. Duration of antitumor effect of DM34 pretreatment on sarcoma-180.

Administration schedule (on days)	Mean body weight gained for 7 days (g/mouse) <sup>a</sup>	Mean survival days <sup>a, b</sup>	ILS (%) <sup>c</sup>	Survivors on 60th day
-20~-16	$8.7 \pm 0.5$	$15.5 \pm 1.4$	34.8	0/8
-15~-11	$4.4 \pm 1.2$	$18.5 \pm 3.8$	60.9	0/8
-13~-9	$7.9 \pm 1.0$	$15.0 \pm 2.4$	30.4	0/8
-11~-7	$5.3 \pm 1.5$	$18.4 \pm 3.7$	60.0	0/8
-9~-5	$3.6 \pm 1.0^*$	$23.0 \pm 4.5^{**}$	100.0	0/8
-7~-3	$2.9 \pm 0.8^{**}$	$26.9 \pm 3.8^{**}$	133.9	1/8
-5~-1	$1.9 \pm 0.6^{**}$	$22.9 \pm 0.9^{**}$	98.9	0/8
None (Control)	$7.2 \pm 0.6$	$11.5 \pm 1.8$	0	0/8

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 7. However, DM34 was injected into the mice for 5 days according to the indicated schedules, and sarcoma-180 cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) were inoculated i.p. on day 0.

<sup>a</sup>, \*and \*\*; See Table 7. <sup>b</sup>; See Table 3. <sup>c</sup>; See Table 1<sup>b</sup>.



非投与対照群と差がみられなかった。

#### IV. 担がんマウスの DTH に対する DM 34 の影響

DM 34 (40 mg/kg/日) を腫瘍細胞移植の 7 日前から 3 日前までの 5 日間に、1 日 1 回腹腔内投与した ddY マウスと、同じスケジュールで生理的食塩水 (0.25 ml/頭/日) を腹腔内投与した ddY マウスにエールリッヒがん細胞を  $2.0 \times 10^6$  細胞/頭腹腔内移植し、SRBC に対する DTH を測定した結果を表 10 に示した。DM 34 を投与せず、腫瘍細胞移植もおこなわないで、SRBC で感作した対照群マウスの足蹠反応の大きさは  $1.54 \pm 0.08$  mm であった。また、DM 34 を投与せず、腫瘍細胞移植もおこなわず、SRBC 感作もおこなわなかった非感作対照群マウスでは、足蹠反応は  $0.09 \pm 0.02$  mm であった。生理的食塩水を投与し、腫瘍細胞を移植したマウスでは足蹠反応の大きさは腫瘍細胞移植 1 日後に感作した実験群の  $0.97 \pm 0.10$  mm から 7 日後に感作した実験群の  $0.23 \pm 0.05$  mm へと腫瘍細胞移植より日数がたつにしたがい大きく低下した。一方、DM 34 を投与し、腫瘍細胞を移植したマウスの足蹠反応の大きさは、腫瘍細胞移植 1 日後に感作した実験群では  $1.38 \pm 0.10$  mm であり、移植 7 日後に感作した実験群では  $1.00 \pm 0.27$  mm で、その低下は軽度

であった。感作日の等しい各対応する DM 34 投与群と生理的食塩水投与群の 2 つの実験群の足蹠反応を比較すると、DM 34 投与群は生理的食塩水投与群より大きい足蹠反応を示した。

#### V. 担がんマウスの免疫担当臓器重量におよぼす前投与 DM 34 の影響

DM 34 (40 mg/kg/日) を腫瘍細胞移植 7 日前から 3 日前までの 5 日間、1 日 1 回腹腔内投与したマウスと、同じスケジュールで生理的食塩水 (0.25 ml/頭/日) を腹腔内投与したマウスにエールリッヒがん細胞 ( $2.0 \times 10^6$  細胞/頭) を腹腔内移植した。これらのマウスについて腫瘍細胞移植 3 日後、6 日後および 12 日後に胸腺、脾臓そして腸間膜リンパ節を摘出して湿重量を測定した結果を表 11 に示した。対照としては、DM 34 (40 mg/kg/日) または生理的食塩水 (0.25 ml/頭/日) を臓器摘出の 7 日前から 3 日前の 5 日間、1 日 1 回腹腔内投与した非担がんマウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節の湿重量を測定した。

DM 34 を前投与した非担がんマウス胸腺の湿重量は  $63.1 \pm 3.9$  mg で、生理的食塩水を前投与した非担がんマウス胸腺の湿重量  $43.7 \pm 3.6$  mg より重く、DM 34 投与により胸腺の肥大がみられた。がん細胞移

Table 9. Effect of DM34 on the delayed-type hypersensitivity (DTH) of mouse to sheep red blood cells (SRBC).

Relative day of DM34 injection to sensitization	Sensitizing with (+) or without (-) SRBC	Footpad swelling (mm)
- 3	+	$1.32 \pm 0.18$
- 2	+	$1.17 \pm 0.09$
- 1	+	$1.59 \pm 0.08^*$
0	+	$1.70 \pm 0.06^{**}$
1	+	$1.89 \pm 0.10^{**}$
2	+	$1.62 \pm 0.10^*$
3	+	$1.71 \pm 0.06^*$
4	+	$1.22 \pm 0.11$
None (Untreated control) <sup>a</sup>	+	$1.33 \pm 0.07$
None (Unsensitized control) <sup>b</sup>	-	$0.31 \pm 0.05$

Male C57 BL/6 mice were used. Mice were injected i.p. with DM34 (40 mg/kg) once according to the indicated schedule. The mice were sensitized with intravenous injection of  $10^6$  sheep red blood cells (SRBC) suspended in 0.2 ml of PS on day 0. On the 4th day after the sensitization, delayed-type hypersensitivity (DTH) was elicited with 0.02 ml of 25 % SRBC in PS (about  $10^8$  SRBC) injected s.c. into the right hind footpad. Thicknesses of both the right and left hind footpads were measured at 24 hours after elicitation, and the difference between these two measurements was described as the intensity of DTH. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4 % HCO-60. Each value of footpad swelling represents mean  $\pm$  S.E.M. of 5 mice. \*: Untreated control mice were not injected with DM34. <sup>b</sup>: Unsensitized control mice were neither injected with DM34 nor sensitized with SRBC. \* and \*\*: Significantly different from untreated control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (with the Student's *t*-test), respectively.

Table 10. Effect of DM34 pretreatment on the DTH of the tumor-bearing mouse to SRBC

Pretreatment	Relative day of sensitizing to tumor inoculation	Relative day of eliciting to tumor inoculation	Footpad swelling (mm)
DM34	1	5	1.38±0.10*
PS	1	5	0.97±0.15
DM34	3	7	1.27±0.23**
PS	3	7	0.46±0.09
DM34	5	9	1.36±0.36**
PS	5	9	0.29±0.02
DM34	7	11	1.00±0.27**
PS	7	11	0.23±0.05
None <sup>a</sup>	—	—	1.54±0.08
None <sup>b</sup>	—	—	0.09±0.02

Female ddY mice were used. The mice were injected with DM34 (40 mg/kg/day) or PS (0.25 ml/head/day) daily on days -7 to -3. On day 0, the mice were inoculated i.p. with Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head). The mice were sensitized subcutaneously with  $10^8$  SRBC in 0.2 ml of PS according to the indicated schedule. Four days after the sensitization, DTH was elicited with 0.02 ml of 25% SRBC in PS (about  $10^8$  SRBC) injected s.c. into the right hind footpad. Thicknesses of both the right and left hind footpads were measured 24 hours after elicitation, and the difference between these two measurements was described as the intensity of DTH. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Each value of footpad swelling represents mean  $\pm$  S.E.M. of 7 mice. <sup>a</sup>; Untreated control group of mice were neither injected with DM34 nor inoculated with Ehrlich carcinoma cells. <sup>b</sup>; Unsensitized control group of mice were not injected with DM34, not inoculated with Ehrlich carcinoma cells and not sensitized with SRBC. \* and \*\*; Significantly different from the relevant PS treated group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (with the Student's *t*-test), respectively.

Table 11. Effect of DM34 pretreatment on the weights of thymus, spleen and mesenteric lymphnode of the Ehrlich ascites carcinoma-bearing mouse

Tissues	Pretreatment	Tissue weight (mg/tissue)			
		Tumor-free mice	Tumor-bearing mice		
			days after tumor inoculation		
			3	6	12
Thymus	DM34	63.1±3.9**	47.2±2.3	45.6±3.5	36.3±6.7**
	PS	43.7±3.6	48.1±2.3	50.0±3.7	12.1±1.2
Spleen	DM34	137.0±6.1	173.8±8.6	243.7±17.0	176.1±10.2**
	PS	127.8±8.8	163.5±11.3	251.1±20.5	90.0±6.1
Mesenteric lymphnode	DM34	72.1±4.9*	113.8±9.8	97.8±11.9	119.0±20.8
	PS	55.8±3.9	95.7±5.7	108.8±12.8	80.3±6.7

The mice were injected i.p. with DM34 (40 mg/kg/day) or PS (0.25 ml/head/day) daily on days -7 to -3. On day 0, the mice were inoculated i.p. with Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) or sacrificed (tumor-free mice). The tumor-bearing mice were sacrificed on day 3, 6 or 12. Then, the thymuses, spleens and mesenteric lymphnodes were removed from these above mice and weighed. DM 34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Each value of the tissue weight represents mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. \* and \*\*; Significantly different from relevant PS treated group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (with the Student's *t*-test), respectively.

植 3 日目と 6 日目のマウスでは、DM 34 前投与群と生理的食塩水前投与群の胸腺の湿重量はほぼ同じで、いずれも 45~50 mg であった。しかし、がん細胞移植 12 日後には、生理的食塩水前投与マウス胸腺の湿重量は著明な低下を示し、 $12.1 \pm 1.2$  mg と、非担がんマウス胸腺の 1/3 以下の湿重量となった。これに対し、DM 34 前投与マウスの胸腺は  $36.3 \pm 6.7$  mg と湿重量の低下は少なく、担がんによる胸腺の萎縮が抑制されていた。

脾臓は担がん初期に著明な湿重量の増大を示した。生理的食塩水前投与マウス脾臓の湿重量は、非担がん時の  $127.8 \pm 8.8$  mg からがん細胞移植 6 日目には  $251.1 \pm 20.5$  mg と増大し、DM 34 前投与マウス脾臓では、非担がん時の  $137.0 \pm 6.1$  mg からがん細胞移植 6 日目には  $243.7 \pm 17.0$  mg となり、どちらも 2 倍近い湿重量の増加がみられた。また、非担がんマウスと、がん細胞移植 3 日目および 6 日目の担がんマウスでは、生理的食塩水前投与群と DM 34 前投与群とで脾臓の湿重量はほぼ同じであった。しかし、がん細胞移植 12 日後には、生理的食塩水前投与マウス脾臓の湿重量は  $90.0 \pm 6.1$  mg となり、著明な脾臓の萎縮がみられた。これに対し、DM 34 前投与マウス脾臓の湿重量は  $176.1 \pm 10.2$  mg であり、脾臓の萎縮は軽度であった。

非担がんマウスの腸間膜リンパ節湿重量は生理的食塩水を前投与した時  $55.8 \pm 3.9$  mg であった。これに対し、DM 34 を前投与したマウスでは  $72.1 \pm 4.9$  mg

となり、DM 34 前投与により腸間膜リンパ節はやや肥大した。担がんマウスでは、生理的食塩水前投与マウスの腸間膜リンパ節と DM 34 前投与マウスの腸間膜リンパ節はともにやや肥大し、その湿重量は、80~120 mg で、がん細胞移植 3 日後、6 日後および 12 日後の各湿重量に変化はみられなかった。

#### VI. 脾抗体産生細胞数におよぼす DM 34 の影響

ddY マウスに  $1.0 \times 10^8$  個の SRBC を静脈内注射して感作する 3 日前から 3 日後の間に 1 回のみ DM 34 (40 mg/kg) を腹腔内投与し、感作から 4 日後の脾臓 PFC 数を測定した結果を表 12 に示した。DM 34 未投与の対照群マウスでは、 $169.2 \pm 20.6 \times 10^3$  PFC/脾臓であった。一方感作 3 日前から 3 日後のいずれかの時期に DM 34 を投与しても、PFC 数は  $130.1 \sim 168.2 \times 10^3$  個/脾臓であり、DM 34 は脾 PFC 数、すなわち脾 IgM 抗体産生細胞数には影響をおよぼさなかった。

#### 考 察

エールリッヒがん細胞またはザルコーマ 180 細胞を腹腔内に移植したマウスに DM 34 を腹腔内投与すると腫瘍増殖の抑制とマウスの生存期間の延長がみられた。さらに、あらかじめ DM 34 を腹腔内投与したマウスに腫瘍細胞を腹腔内移植した場合にも腫瘍増殖の抑制とマウスの生存期間の延長がみられた。一方、DM 34

Table 12. Effect of DM34 on the formation of plaque-forming cells (PFC) in the spleen of mice sensitized with SRBC

Relative day of DM34 injection to sensitizing with SRBC	PFC/Spleen ( $\times 10^3$ )
- 3	$168.2 \pm 25.9$
- 2	$154.4 \pm 15.4$
- 1	$159.0 \pm 12.4$
0	$130.3 \pm 19.2$
1	$136.2 \pm 15.2$
2	$130.9 \pm 12.2$
3	$130.1 \pm 23.3$
(Control)	$169.2 \pm 20.6$

Mice were injected i.p. with DM34 (40 mg/kg) once according to the indicated schedule. These mice were sensitized with intravenous injection of  $10^8$  SRBC in 0.2 ml PS on day 0. On the 4th day after sensitization, the spleen cells were obtained from these mice and suspended in 5 ml Hanks balanced salt solution supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS-HBSS). After the cells were counted, the spleen cell suspension was diluted to 8 fold with FBS-HBSS. Then  $25 \mu$ l of spleen cell suspension and  $15 \mu$ l of indicator red cell suspension (0.2 ml of 20% washed SRBC suspended in FBS-HBSS, 0.2 ml of guinea pig complement and 0.7 ml of FBS-HBSS) were mixed, and the mixture was placed into the Cunningham's chamber. The chamber was incubated  $37^\circ\text{C}$  for 1 hour after sealed by paraffin wax. The hemolytic plaques were then counted and the number of plaque forming cells (PFC) was expressed as PFC/Spleen. DM34 was suspended to 4 mg/ml in PS containing 4% HCO-60. Each value of the PFC represents mean  $\pm$  S.E.M. of 5 mice. \*; The control group of mice were not injected with any agents.

と同じ *d*-morphinan 骨格をもつデキストロメトルファンとジメモルファンも、エールリッヒ腹水がん細胞またはザルコーマ 180 細胞を腹腔内移植したマウスに腹腔内投与することによりマウスの生存期間を延長することが Kigoshi, S.ら<sup>6)</sup>により報告されている。しかし、デキストロメトルファンおよびジメモルファンを腫瘍細胞移植前に投与した時には延命効果も腫瘍増殖抑制効果もみとめられなかった。このように腫瘍移植前投与による抗腫瘍効果において DM 34 はデキストロメトルファンやジメモルファンと異なっており、DM 34 には宿主介在性の抗腫瘍効果があると考えられた。

担がん宿主を介して非特異的に抗腫瘍効果をあらわす免疫アジュバントとしては、細菌類、多糖類、合成アジュバントなど多数知られている<sup>27)</sup>。これらの作用機序としては、腫瘍細胞傷害性マクロファージの活性化や Natural Killer 細胞の活性化などが考えられている。これらの非特異的免疫アジュバントのうち、DM 34 のように腫瘍移植の前に投与することにより抗腫瘍効果をあらわすものとしては、細菌またはその成分である *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)<sup>28)~30)</sup>、*Corynebacterium parvum*<sup>31)32)</sup> OK-432<sup>33)34)</sup> と *Klebsiella* 03 リポ多糖体<sup>35)</sup> や、イソプレノイド抗生物質である Ascofrandone<sup>36)</sup> などが知られている。これらの物質の腫瘍細胞移植前投与による抗腫瘍効果は腫瘍細胞移植に対する薬物の投与時期、すなわち両者の時間的關係により大きく影響されることが報告されている<sup>31)34)</sup>。BCG は Lewis 肺癌細胞移植 4 日前に腹腔内投与した時には抗腫瘍効果をあらわすが、移植 2 週以上前に投与した時には逆に腫瘍増殖を促進することが報告されている<sup>30)</sup>。また、*Corynebacterium parvum* は腫瘍細胞移植 2 日前に投与した時にその抗腫瘍効果は最大を示している<sup>31)</sup>。OK-432 では、腫瘍細胞移植 4 日前に 1 回投与した時<sup>33)</sup>、および移植前に 4 日間連続投与した時<sup>34)</sup>に抗腫瘍効果がみられている。*Klebsiella* 03 リポ多糖体では、腫瘍細胞移植 4 日前の 1 回投与あるいは 7 日前から 2 日前までの 5 日間投与で抗腫瘍効果がみられている<sup>35)</sup>。Ascofrandone は、L 1210 白血病細胞移植 7 日前に 1 回、あるいは 8 日前と 4 日前の 2 回投与した時、または、ザルコーマ 180 細胞移植 7 日前、5 日前および 3 日前の計 3 回投与した時に抗腫瘍効果をあらわしたが、腫瘍細胞移植と同時に投与した時には無効であることが示されている<sup>36)</sup>。DM 34 は腫瘍細胞移植 2 日前に 1 回投与した時には抗腫瘍効果はみられなかった。しかし、エールリッヒ腹水がんに対しては、4 日あるいは 5 日間連続して、またザルコーマ 180 に対しては 5 日間連続して前投与した時に腫瘍

増殖抑制と担がんマウスの生存期間を延長させる抗腫瘍効果がみられた。また、その抗腫瘍効果は、DM 34 の前投与と腫瘍細胞移植との間の期間が長くなるにしたがい徐々に低下した。

上記の如く、DM 34 が宿主介在性の抗腫瘍効果をもつと考えられたことから、DM 34 のマウス免疫機構への作用について検討をおこなった。その結果、DM 34 は BCG をはじめとする多くの抗腫瘍免疫アジュバントと同様に<sup>27)</sup>マウスの SRBC に対する DTH を増強した。さらに担がんマウスの SRBC に対する DTH の低下を軽減した。また、DM 34 は担がんによる胸腺および脾臓の萎縮を抑制する成績が得られた。これらのことから、DM 34 は細胞性免疫能を増強し、担がんによる細胞性免疫能低下を抑制する作用があると考えられた。最近、DTH に関与する  $\text{Lyt-1}^+$ ,  $2^-$ ,  $3^-$  の T 細胞が *in vivo* で腫瘍細胞に破壊的にはたらく、あるいは、局所でマクロファージを活性化し、この活性化マクロファージが腫瘍細胞を破壊する<sup>17)37)~39)</sup>との考え方が示されており、DM 34 の抗腫瘍活性との関連から興味深い。一方、DM 34 はマウスの SRBC に対する脾抗体産生細胞数には影響をおよぼさず、液性免疫への作用はないと考えられた。

以上のことから、DM 34 はマウスの細胞性免疫能を増強し、宿主介在性の抗腫瘍作用をもつ新規化合物であると考えられた。しかし、その作用機序、ならびに生体内動態については不明の点が多く、さらに検討が必要であると考えられた。また、*d*-morphinan 骨格を有する化合物の構造と抗腫瘍効果との関係もさらに検討すべき課題と考えられた。

## 結 論

*d*-morphinan 骨格をもつ新規化合物 DM 34 の抗腫瘍作用について検討し、以下の成績を得た。

I. DM 34 はエールリッヒ腹水がんおよびザルコーマ 180 を移植したマウスに対して、腫瘍移植前あるいは移植後に投与した時、マウスの生存期間を延長し、腫瘍増殖を抑制した。

II. DM 34 はマウスの SRBC に対する DTH を増強したが、SRBC に対する脾抗体産生細胞数には影響をおよぼさなかった。

III. DM 34 を腫瘍移植前に投与することにより、担がんマウスの脾臓および胸腺の萎縮を抑制し、SRBC に対する DTH の低下を軽減した。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、本研究に御指導御校閲を賜った正印達教授ならびに御指導を賜った福井医科大学薬理学教室木

越茂教授に深く感謝の意を表します。

# 文 献

- 1) Jaffe, J. H. & Martin, W. R.: Opioid analgesics and antagonists p494-534. *In* Gilman, A. G., Goodman, L. S. & Gilman, A. (ed.), The pharmacological basis of therapeutics, 6th ed. Macmillan Publishing Co. Inc., New York, 1980.
- 2) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Heroin prolongs survival time and retards tumor growth in mice with neuroblastoma. *Brain Res. Bull.*, **7**, 25-32 (1981).
- 3) Aylsworth, C. F., Hodson, C. A. & Meites, J.: Opiate antagonists can inhibit mammary tumor growth in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **161**, 18-20 (1979).
- 4) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Naloxone prolongs the survival time of mice treated with neuroblastoma. *Life Science*, **28**, 1095-1102 (1981).
- 5) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. *Science*, **221**, 671-673 (1983).
- 6) Kigoshi, S.: Effect of pentazocine on Ehrlich ascites tumor cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **31**, 781-785 (1981).
- 7) Kigoshi, S., Nishio, M. & Kokubo, M.: Effect of the centrally acting antitussives on ascites tumor cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **33**, 343-348 (1983).
- 8) Saito, K., Nishioka, K., Iwatsuki, K., Kumagai, K. & Sasaki, M.: Effect of morphine on PHA-stimulated human lymphocyte transformation. *Tohoku J. exp. Med.*, **117**, 199-200 (1975).
- 9) Güngör, M., Genç, H., Sağduyu, H., Eroğlu, L. & Koyuncuoğlu, H.: Effect of chronic administration of morphine on primary immune response in mice. *Experientia*, **36**, 1309-1310 (1980).
- 10) 柳浦才三・西村友男・三澤美和: 気道の1次体液性免疫に及ぼす Codeine および Morphine の影響. *日薬理誌*, **81**, 315-322 (1983).
- 11) Saito, K., Nishioka, K., Iwatsuki, K., Kumagai, K. & Sasaki, M.: The effect of pentazocine on PHA-stimulated human lymphocyte transformation. *Tohoku J. exp. Med.*, **116**, 229-231 (1975).
- 12) 小久保護・川尻博男・木越 茂・正印 達: デキストロメトルファン誘導体のマウス同種腫瘍に対する抗腫瘍効果. 第43回日本癌学会総会記事(福岡). 284 (1984).
- 13) Miller, R. G. & Phillips, R. A.: Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.*, **73**, 191-202 (1969).
- 14) Tulp, A. & Welagen, J. J. M. N. Fractionation of ascites tumour cells at 1g: Separation of cells in specific stages of the life cycle. *Europ. J. Cancer*, **12**, 519-526 (1976).
- 15) Kigoshi, S.: Decrease of cholesterol and free fatty acid in cortisone-resistant lymphoid cells incubated with allogeneic tumor cells. *Experientia*, **35**, 836-838 (1974).
- 16) 東京大学医科学研究所学会編: 細菌学実習提要, 改訂5版. 261-264, 丸善, 東京 1976.
- 17) Greene, M. I., Schatten, S. & Bromberg, J. S.: Delayed hypersensitivity. p685-696, *in* Paul, W. E. (ed.), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1984.
- 18) Lagrange, P. H., Mackaness, G. B. & Miller T. E.: Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. *J. Exp. Med.*, **139**, 528-542 (1974).
- 19) Mitsuoka, A., Teramatsu, M., Baba, M., Morikawa, S. & Yasuhira, K.: Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes: evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction. *Immunology*, **34**, 363-370 (1978).
- 20) Pinkerton, W. & Weber, M.: A method of injecting small laboratory animals by the ophthalmic plexus route. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **116**, 959-961 (1964).
- 21) Marbrook, J.: Hemolytic plaque assays. 3.5 Liquid matrix (Slide method)., p.86-88. *In* Mishell, B. B. & Shiigi, S. M. (ed.), *Selected methods in cellular immunology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- 22) Cunningham, A. J.: A method of increased sensitivity for detection single antibody-forming cells. *Nature*, **207**, 1106-1107 (1965).
- 23) Cunningham, A. J. & Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, **14**, 599-600 (1968).
- 24) Shirahata, T. & Shimizu, K.: Production and properties of immune interferon from spleen cell cultures of toxoplasma infected mice. *Microbiol. Immunol.*, **24**, 1109-1120 (1980).

- 25) 池田周紹: マウス脾細胞インターフェロン誘起に対する A 群溶連菌の影響。十全医誌, **92**, 423-433 (1983).
- 26) Hennry, C.: Hemolytic plaque assays. 3.1 Introduction., p69-71. In Mishell, B. B. & Shiigi, S. M. (ed.), Selected methods in cellular immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- 27) 東 市郎・小倉 剛: 腫瘍に対する免疫応答の強化—癌の免疫学的治療の試み—. 261-311 頁, (東 市郎・高橋利忠編) 岩波講座 免疫科学 7 移植免疫と腫瘍免疫. 岩波書店, 東京, 1984.
- 28) Old, L. J., Clarke, D. A. & Bernacerraf, B.: Effect of Bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumours in the mouse. Nature, **184**, 291-292 (1959).
- 29) Weiss, D. W., Bonhag R. S. & Deome K. B.: Protective activity of fractions of Tubercle bacilli against isologous tumours in mice. Nature, **190**, 889-891 (1960).
- 30) 奥中規由: Lewis 肺癌の増殖・転移に及ぼす BCG の影響。四国医誌, **38**, 371-380 (1982).
- 31) 千原呉郎: 癌と免疫療法—新しい宿主抵抗増強抗癌物質の開拓—. 112-124 頁, 講談社, 東京, 1980.
- 32) Woodruff, M. F. A. & Boak, J. L.: Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumour transplants in isogenic hosts. Br. J. Cancer, **20**, 345-355 (1966).
- 33) Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. & Kikuchi, K.: Inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann, **67**, 115-119 (1976).
- 34) Yamagishi, H., Pellis, N. R. & Kahan, B. D.: Streptococcal immunotherapy of a chemically induced murine fibrosarcoma: Effect of dose, route, sham surgery, and splenectomy on adjuvant action. Cancer Immunol. Immunother. **9**, 63-67 (1980).
- 35) Miyamoto, K., Koshiura, R., Hasegawa, T. & Kato, N.: Antitumor activity of *Klebsiella*03 lipopolysaccharide in mice. Jpn. J. Pharmacol., **36**, 51-57 (1984).
- 36) Magae, J., Hosokawa, H., Ando, K., Nagai, K. & Tamura, G.: Antitumor protective property of an isoprenoid antibiotic, ascofranone. J. Antibiotics, **35**, 1547-1552 (1982).
- 37) 橋本嘉幸・北條博史: 担癌生体の免疫応答. 215-260 頁, (東 市郎・高橋利忠編) 岩波講座 免疫科学 7 移植免疫と腫瘍免疫. 岩波書店, 東京, 1984.
- 38) Greenberg, P. D., Cheever, M. A. & Fefer, A.: Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune synergic Lyt-1<sup>+</sup> 2<sup>-</sup> lymphocytes. J. Exp. Med., **154**, 952-963 (1981).
- 39) Perry, L. L. & Green, M. I.: The relationship between tumor antigens and alloantigens: Cross-reactivity due to differential context of T cell antigen recognition. J. Immunol., **125**, 738-748 (1980).

**Studies on Antitumor Effect of *d*-3-Cinnamyloxy-N-Methylmorphinan** Hiroo Kawaziri, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **94**, 54-68 (1985)

**Key words:** antitumor activity, *d*-morphinan, Ehrlich ascites carcinoma, sarcoma-180, delayed-type hypersensitivity

#### Abstract

The antitumor and immunopotentiating effects of *d*-3-cinnamyloxy-N-methylmorphinan (DM34), a newly synthesized *d*-morphinan derivative, were examined. DM34, as well as dextromethorphan and dimemorphan, was effective in inhibiting tumor growth *in vivo* and prolonging the life span of tumor-bearing mice when administered after tumor inoculation. Intraperitoneal injection of DM34 into ddY mice at a dose of 40 mg/kg/day for 5 successive days starting at 24 hours after intraperitoneal inoculation of Ehrlich carcinoma cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/head) suppressed tumor growth and prolonged the mean survival time of tumor-bearing

mice by 57.7% in comparison with tumor bearing mice treated with physiological saline. The life prolonging effect of DM34 was more evident when DM34 was injected prior to tumor implantation, but this effect was not shown by the pretreatment with dextromethorphan or dimemorphan. A prolongation in the mean survival time of 157.7% was found in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice which had been injected i.p. with DM34 (40 mg/kg/day) for 5 successive days starting 7 days prior to tumor inoculation. Moreover life prolonging effect was also observed in mice injected i.p. with DM34 (40 mg/kg/day) for 4 successive days starting at 4 to 24 days prior to Ehrlich ascites carcinoma inoculation. The prolongation of the mean survival time was gradually decreased along with the increase of the interval between DM34 injection and tumor inoculation. Similar antitumor effects of DM34 were shown in the mice inoculated i.p. with sarcoma-180. DM34 affected cellular immunity in mice. Delayed-type hypersensitivity (DTH) of the C57 BL/6 mouse to sheep red blood cells (SRBC) was augmented when DM34 (40 mg/kg) was injected once between 1 day before and 3 days after SRBC sensitization. DM34, injected daily for 5 successive days starting 7 days prior to Ehrlich tumor inoculation at a dose of 40 mg/kg/day, inhibited the decrease of DTH of the tumor-bearing mouse, and also inhibited the decrease of the weight of the thymus and spleen of the tumor-bearing mouse. However, DM34 had no effect on the number of spleen antibody-forming cells of the mouse immunized with SRBC. These results suggest that DM34 has a host-mediated antitumor activity and augments cellular immunity in mice.